

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-173164

(43) 公開日 平成8年(1996)7月9日

| (51) Int. Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|----------------------------|-------|---------|----------------|---------|
| C 1 2 N 15/09 | Z N A | | | |
| G 0 1 N 33/566 | | 9162-4B | C 1 2 N 15/ 00 | Z N A A |

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平6-320288

(22) 出願日 平成6年(1994)12月22日

(71) 出願人 000005108

株式会社日立製作所

東京都千代田区神田駿河台四丁目6番地

(72) 発明者 神原 秀記

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(72) 発明者 岡野 和宣

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(72) 発明者 藤森 清

東京都国分寺市東恋ヶ窪一丁目280番地

株式会社日立製作所中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 平木 祐輔

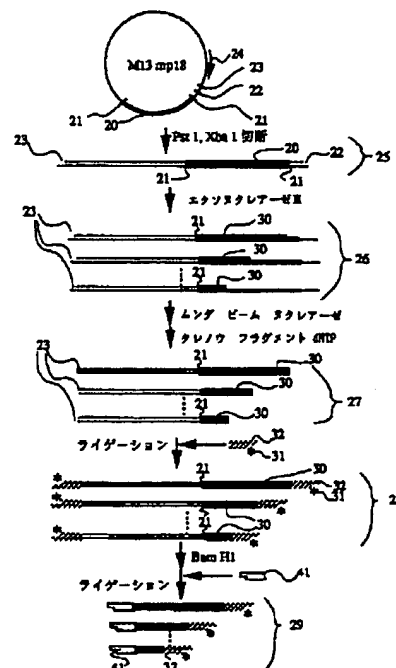
(54) 【発明の名称】 DNA調製法

(57) 【要約】

【目的】 DNA解析に必要な試料調整をクローニングプロセスを用いずに選別PCR増幅により行う手法を提供する。

【構成】 DNA末端にオリゴマーを結合し、このオリゴマー部にハイブリダイズし、3'末端に選別配列を持つプライマーでPCR増幅して特定の断片だけを選別増幅する。

【効果】 クローニングなど手間のかかるプロセスが不要となり、試料調整の全自動化が可能となる。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 二本鎖DNAを断片化处理し、複数種のDNA断片を生成するプロセスと、切断部にライゲーション反応で既知配列を持つオリゴマーを前記DNA断片に結合するプロセスと、前記既知配列のオリゴマーに対し相補的なオリゴヌクレオチド配列を含みかつその3'末端に1～4塩基からなる選別配列を持つプライマーを用いて前記DNA断片の相補鎖合成をすることによりDNA断片のコピー数を増幅するプロセスとを含むことを特徴とするDNA調製法。

【請求項2】 二本鎖DNAの断片化处理が、制限酵素処理によるものであることを特徴とする第1項記載のDNA調製法。

【請求項3】 二本鎖DNAの断片化处理が、エクソヌクレアーゼおよびS1ヌクレアーゼ処理によるものであることを特徴とする第1項記載のDNA調製法。

【請求項4】 二本鎖DNAの断片化处理が、S1ヌクレアーゼを用いて一本鎖DNA部分を分解し、DNAポリメラーゼ及びリガーゼを用いて二本鎖DNAを修復するプロセスを含むものであることを特徴とする第1項記載のDNA調製法。

【請求項5】 二本鎖DNAの断片化处理が、レーザーを用いた物理的切断によるものであることを特徴とする第1項記載のDNA調製法。

【請求項6】 二本鎖DNAの断片化处理が超音波を用いた物理的切断であることを特徴とする第1項記載のDNA調製法。

【請求項7】 二本鎖DNAを断片化处理し、複数種のDNA断片を生成するプロセスと、切断部にライゲーション反応で既知配列を持つオリゴマーを前記DNA断片の一端に、そして別種の既知配列を持つオリゴマーを前記DNA断片の他端に結合するプロセスと、前記既知配列のオリゴマーに対し相補的なオリゴヌクレオチド配列を含むプライマー及び前記別種の既知配列のオリゴマーに対し相補的なオリゴヌクレオチド配列を含みかつその5'末端及び3'末端にそれぞれ蛍光標識及び1～4塩基からなる選別配列を持つプライマーを用いて前記DNA断片の相補鎖合成をすることによりDNA断片のコピー数を増幅するプロセスとを含むことを特徴とするDNA調製法。

【請求項8】 少なくとも二本鎖DNAを断片化处理し、切断部に既知配列を持ったオリゴマーを結合するプロセスと、前記結合したオリゴマーに対し相補的なオリゴヌクレオチド配列を含みかつその3'末端に1～4塩基からなる選別配列を持つプライマーを少なくとも1種用いて前記DNA断片をPCR増幅するプロセスと、ゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、分取するプロセスとを含むことを特徴とするDNA調製法。

【請求項9】 複数の2本鎖DNAを含むDNA断片群に既知配列を持ったオリゴマーを結合させ、その3'末

端に1～4塩基からなる選別配列を持ち且つ前記結合したオリゴマーに相補的なオリゴヌクレオチド配列を含むプライマーを用いて少なくとも1回以上相補鎖合成して、DNA断片のDNAコピーを増幅するプロセスを含むことを特徴とするDNA調製法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はDNA解析、特に長いDNAの効率よい解析法および解析システムに関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来、長いDNAの解析ではクローニングを用いる方法が用いられていた。すなわち、長いDNAを断片化し、これらの断片群をプラスミドなどのベクター中に組み込んだ後に大腸菌に感染させ、これを寒天培地で培養する。目的DNAを組み込まれたプラスミドを有する大腸菌だけが生き残るような培地で培養すると、寒天上にコロニーが出現する。これは単一の大腸菌であり、従って同一のDNA断片を有するプラスミドを含んだ大腸菌が増殖したものであり、これらのうち単一コロニーから大腸菌を取り培養することにより、DNA断片を精製し、かつ、コピー数を増やして得ることができる。

【0003】このようなクローニングと培養プロセスを経て得たDNAを用い塩基配列決定などを行っていた。しかしながら、このような従来法では解析しようとするDNAを多量調製するためにはそのDNAのクローニングおよび大腸菌の培養を行なうプロセスを必要とし、複雑で人手を要するうえ、自動化に不向きであり、ヒトゲノムなどの大容量のDNA解析に用いるには問題が多かった。

【0004】また、制限酵素を用いて長いDNAの短小断片を作り個々の断片の配列を決定してつなげて行く方法もあるが、制限酵素切断で得られる断片サイズは不揃いで一度に解析できないサイズの物も多い。更に断片同志をつなげてゆく手間がかかる難点があり、前記方法同様に自動化に不向きであり大容量のDNA解析には適さない方法である。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、その3'末端に1～4塩基からなる選別配列を含むプライマーを用いて解析しようとするDNAを選択的に増幅することにより、DNAのクローニングおよび大腸菌の培養を行なうことなく、DNA試料を調製することに成功し、本発明を完成した。そして、この方法はDNAのクローニング及び大腸菌の培養プロセスを必要としないものであるから、自動化に適したDNA試料調製法である。

【0006】

【課題を解決するための手段】本発明は、二本鎖DNA

10

20

30

40

50

3

を断片化处理し、複数種のDNA断片を生成するプロセスと、切断部にライゲーション反応で既知配列を持つオリゴマーを前記DNA断片に結合するプロセスと、前記既知配列のオリゴマーに対し相補的なオリゴヌクレオチド配列を含みかつその3'末端に1~4塩基からなる選別配列を持つプライマーを用いて前記DNA断片の相補鎖合成をすることによりDNA断片のコピー数を増幅するプロセスとを含むことを特徴とするDNA調製法である。

【0007】上記二本鎖DNAの断片化处理としては、制限酵素処理、エクソヌクレアーゼおよびS1ヌクレアーゼ処理、レーザーを用いた物理的切断処理、超音波を用いた物理的切断処理などが挙げられる。また、この二本鎖DNAの断片化处理には、その断片化処理の過程で形成される一本鎖のループ状のDNA鎖をS1ヌクレアーゼで分解除去し、二本鎖DNAの欠落部をDNAポリメラーゼ及びリガーゼを用いて修復するプロセスを含む処理法も含まれる。

【0008】さらに、本発明は、二本鎖DNAを断片化处理し、複数種のDNA断片を生成するプロセスと、切断部にライゲーション反応で既知配列を持つオリゴマーを前記DNA断片の一端に、そして別種の既知配列を持つオリゴマーを前記DNA断片の他端に結合するプロセスと、前記既知配列のオリゴマーに対し相補的なオリゴヌクレオチド配列を含むプライマー及び前記別種の既知配列のオリゴマーに対し相補的なオリゴヌクレオチド配列を含みかつその5'末端及び3'末端にそれぞれ蛍光標識及び1~4塩基からなる選別配列を持つプライマーを用いて前記DNA断片の相補鎖合成をすることによりDNA断片のコピー数を増幅するプロセスとを含むことを特徴とするDNA調製法である。

【0009】さらに、本発明は、少なくとも二本鎖DNAを断片化处理し、切断部に既知配列を持ったオリゴマーを結合するプロセスと、前記結合したオリゴマーに対し相補的なオリゴヌクレオチド配列を含みかつその3'末端に1~4塩基からなる選別配列を持つプライマーを少なくとも1種用いて前記DNA断片をPCR増幅するプロセスと、ゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、分取するプロセスとを含むことを特徴とするDNA調製法である。

【0010】さらに、本発明は、複数の2本鎖DNAを含むDNA断片群に既知配列を持ったオリゴマーを結合させ、その3'末端に1~4塩基からなる選別配列を持ち且つ前記結合したオリゴマーに相補的なオリゴヌクレオチド配列を含むプライマーを用いて少なくとも1回以上相補鎖合成して、DNA断片のDNAコピーを増幅するプロセスを含むことを特徴とするDNA調製法である。

【0011】本発明では二本鎖DNAを制限酵素処理、エクソヌクレアーゼおよびS1ヌクレアーゼ処理、レーザ

4

ーを用いた物理的切断処理、超音波を用いた物理的切断処理等で断片化し、この未知のDNA断片の末端に既知DNA断片を結合させ、PCR (Polymerase Chain Reaction) 等で増幅可能な形とする。すなわち、種々の長さのDNA断片をゲル電気泳動を用いて、その長さ毎に大まかに分離し分取する。あるいはDNA断片をエクソヌクレアーゼなどにより末端消化し短い断片とする反応を反応時間等を調節して行ない、長さの異なる断片群を得る。次いで末端に既知配列のオリゴマーをリガーゼを用いて結合させる。この場合、各断片群内のDNA断片の長さはほぼ一定であるが、厳密には種々の長さのものが含まれる。

【0012】上記制限酵素としては、Sau3A, TaqI, Pst I, MaeI, HindIII, EcoRI 等が用いられる。エクソヌクレアーゼ、S1ヌクレアーゼ、リガーゼはいずれも市販の製品が用いられる。次いで末端が特定のDNA配列を持つ未知のDNA断片を、上記既知配列のオリゴマーに対し相補的なオリゴヌクレオチド配列を含みかつその3'末端に1~4塩基からなる選別配列を持つプライマーを用いてDNA相補鎖合成反応を繰り返し用いて増幅し、のコピー数を増やす。ここで、選別配列の塩基数が例えば1塩基の場合は4種類、2塩基の場合は16種類、3塩基の場合は64種類のDNA断片を選択増幅することができる。これにより末端が特定の配列のDNAを精製し、調製することができる。

【0013】上記未知のDNA断片の末端に結合させる既知配列のオリゴマーの長さは10~50塩基、好ましくは18~30塩基である。この塩基長が10塩基より短いとプライマーが安定にハイブリダイズせずPCR増幅効率さが下がる。50塩基より長いと合成に手間がかかる。

【0014】

【作用】DNA断片をゲル電気泳動分離して分取すると末端消化により得たDNA断片群中に含まれるDNAの長さはほぼそろっており、全くランダムな長さのDNAが含まれる場合に比べるとかなりの程度選別された長さのDNA断片だけが分取される。更にこれら断片種の中で末端1~4塩基のうち特定塩基配列を持つ断片だけが相補鎖合成反応で増幅されるので、この結果末端塩基配列を選別することによりDNA断片を精製することができる。更に相補鎖合成反応を繰り返し用いることでそのコピー数を増やすことができる。

【0015】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明する。ただし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【実施例1】第1の例は末端消化により得たDNA断片を用いる例である。長いDNAを解析するときには第1図に示したように片方の末端3が一定で他方の末端4が種々の位置で切断されたDNA断片群5を用いて6のよ

うに順次配列をよんで行く方法が有効である。DNAの末端を消化する方法の1つにエキソヌクレアーゼ (Exonuclease) (アマシャム社製) とS1ヌクレアーゼ (nuclease) (アマシャム社製) を組み合わせて末端塩基を順次分解してゆく方法がある。ベクターに組みこまれた長いDNA (10 kb程度) を例に考える。ベクターにはプラスミド、M13mp18 (アマシャム社製) のようなM13系ファージの2本鎖DNAなどを用いる。2本鎖状態のM13mp18を用いた例を図2に示した。制限酵素Bam HIサイト21に塩基配列を決定しようとするDNA20をクロ

10 ニングする。このベクターはBam HIサイト21とプライマーアニーリング部位24の間にXbaI22およびPstI23の切断部位を持つ。両酵素で切断すると図2に示した長いDNA断片25が得られる。これにエキソヌクレアーゼIII (アマシャム社製) を数分間作用させる。エキソヌクレアーゼIIIは5' 突出末端および平滑端を持つ2本鎖DNAを3' 末端から順次分解する。反応時間を変化させて生成物を得ることにより図2の2本鎖部分30が種々長さの挿入DNA群26を分取することができる。次いでムンクベーンヌクレアーゼ (アマシャム社製) およびクレノウフラグメント (DNAポリメラーゼ) (アマシャム社製) を作用させ、一本鎖部分を除去して平滑端を持つDNA群27を得る。平滑端を持ち既知配列のオリゴマー32をライゲーションにより結合させる。オリゴマー32が逆向きに結合することを防止するため非結合端は平滑端とせず、また分取時のモニター用に非結合端の5' 末端に蛍光体31を入れておく。ライゲーション反応は6時間~12時間行なう。次に制限酵素Bam HIで切断し、切断部に既知配列のオリゴマー41をライゲーションで結合する。Bam HIサイトに結合するオリゴマー41の配列は平滑端に結合したオリゴマー32の配列と異なるものにしておく。このDNA断片のBam HIサイト側は一定の部位で切断されオリゴマーが結合しているが平滑端側はデリーションによるため厳密に一定の位置で切断されたものにオリゴマーがついたものでなく、1つの群には種々長さのDNA断片の混合したものが含まれる。DNAシーケンス反応はオリゴマー32側から行なうので、このままでは種々配列が混合した信号が得られ、うまく配列決定できない。そこで混合物の中から特定の長さのDNA断片だけを選びだして塩基配列決定する必要がある。従来はこれらフラグメントを再度クローニング (サブクローニング) し、コロニー培養後特定のコロニーを得て再度培養することによりDNA断片の精製とコピー数の増幅をしていた。ここでは従来のサブクローニングに代えて、選択PCRにより特定のDNAだけを増幅した。DNA断片のオリゴマー32に続く部分は断片種毎に異なる配列をしている。一方、DNA相補鎖合成を行なうとき、プライマーの3' 末端側2塩基が完全にハイブリダイズしているときには相補鎖合成が起こるが、完全でない場合には相補鎖合成はお

きないか、非常にすくない。そこで結合させたオリゴマー32に続く2塩基が断片種毎に異なるであろうこと (断片種が多いときは2塩基の配列が同じ異種断片がありえる) を利用して、特定のDNA鎖だけを選びだし、増幅した。用いた増幅用プライマーと両端にライゲーションでオリゴマーを導入したフラグメント2々の関係を図3に示した。オリゴマー41にハイブリダイズするプライマー51とオリゴマー32に結合しその5' 末端に蛍光標識を持つオリゴマー61とこれに続く配列TG62部分を持ったプライマー52を用いた。なお、この配列TGはDNA断片種をその5' 末端の塩基配列の種類により選択するための選択配列である。したがって、選択配列が2塩基の場合は配列TGの他に15種の選別配列があり、これら15種の5' 末端の塩基配列を有するDNA断片種を選択的に増幅することができる。プライマー51はすべての断片に共通してハイブリダイズする。一方、プライマー52が完全にハイブリダイズし、相補鎖合成が効率良く起こるのは末端が共通配列に続いてACの配列を持ったものである。PCR増幅によりその長さの異なる複数の断片種のうちの特定種だけを増幅することができた。これを図4により説明する。1つのフラクションの中には種々の長さのDNA断片がありそのコピー数の分布は図4の上図の71のようである。この混合DNA断片について、例えばその末端配列がTGのプライマーで増幅すると前記混合DNA断のうち末端配列がACのDNA断片のみが選択的に増幅され、図4の上図の72のようになる。したがって、混合DNA断のうちから特定の本のDNA断片を抜き出すことができ

る。

【0016】以上、酵素による末端消化産物 (デリーション産物) 中の特定断片だけを増幅し、得る方法を示したが、末端消化の反応時間を変化させることにより、大まかに長さのそろった種々断片長のDNA群を得ることができる。これらDNA断片群を前記の方法で処理することにより、各グループ内の特定断片種だけを増幅してグループ毎に長さをそろえることが出来、これらを順次解析することにより長いDNAのシーケンシングを行なうことができる。

【0017】〔実施例2〕上記の特定DNA断片を増幅する方法で得たDNA断片群中に複数の長さのDNA断片が依然として含まれるときには次の方法で精製することができる。第5図にその概要を示した。デリーションで生じた種々長さのDNA断片100が1つのグループ(a)内には存在する。(b)のように前記DNA断片の両末端に既知オリゴマー41、および32を結合させる。次いで、これをPCR増幅する。このときオリゴマー32側にハイブリダイズするプライマー52は共通配列61とその3' 末端側に塩基選別用の2塩基62、(ここではTGとした) を持つため、種々断片のうちTG部分が完全に一致する断片だけがPCRで増幅される。この結

果(c)のように3種の断片が生じた。プライマーを除去後これらを混合して熱変性し、再アニールすると、(d)のように同じ長さのDNAペアに加えて長さの異なるペアが生じる。これらDNAの末端部は共通なので途中にループ101ができることになる。この一本鎖部分をS1ヌクレアーゼで消化すると102のように二本鎖の一部に切れ目のある型となる。切れ目部分が1塩基以上抜けていると後のリガーゼ修復反応が進まない。そこで103のようにDNAポリメラーゼを作用させ相補鎖合成し、続いてDNAリガーゼで2本鎖を修復するが、DNAポリメラーゼ及びDNAリガーゼで2本鎖を修復すると短いDNA鎖の比率が高い状態となる。これを数回繰り返すことで複数種のDNA鎖を104のように短いものに一本化していくことができる。このようにデリジョンで得た1つの断片群の長さをそろえていくことができる。このS1ヌクレアーゼを用いるプロセスをオリゴマーをライゲーションする前の(a)の段階で用いてもよい。

【0018】〔実施例3〕上記実施例2はDNAをデリジョンにより短小化したが、超音波による切断、レーザーによる切断、あるいは化学的切断をしたものについても同様に扱える。たとえば超音波による切断を用いた例を図6に示す。超音波を用いる切断では切断は120のように無作為におこる。そこで得られる断片はDNAの種々な部分からランダムに得られる。解析効率を上げるには特定部位を起点にして種々長さのDNA断片を得るのが都合がよい。そこで対象とするDNAの両側に蛍光標識111とビオチン112のついたオリゴマー110をライゲーションで結合させる。オリゴマーの蛍光標識の入った側はライゲーションできないよう処理しておく。このように標識を導入したDNAを断片化し、切断部を平滑化してオリゴマー121を再度ライゲーションで結合させる。生成した断片をゲル電気泳動を用いてサイズ分画する。ストレプトアビジン131を保持した磁気ビーズ130を用いてビオチンが結合しているDNA断片だけを抜き取り、オリゴマー110とオリゴマー121に相補的なプライマーを用いてPCR増幅する。このとき、図5と同様にオリゴマー121にハイブリダイズするプライマーは相補配列に加えて3'側に塩基選別用の配列、例えばTGを持つものを使用する。これにより似た長さのDNA断片群の中から特定の物だけを選んで増幅する。この結果サイズ分画した各グループについてそれぞれ1~3本のDNA断片を得ることが出来た。複数本のDNA断片が含まれるグループについては前述したようにS1ヌクレアーゼを用いて1本に調製した。

【0019】以上の試料調製により、DNAの末端からほぼ一定の長さ間隔を持つ一群のDNA断片を得ることができる。そこで、これらを順に塩基配列決定することによりむだなくDNAの配列決定を行なうことができる。長さ毎に各群に属するDNA断片の長さの差は30

0塩基長程度に調製するのがよい。これはDNAシーケンサーで容易に配列を読める長さが400塩基長程度のためである。より長いDNA断片の配列が決定できる長いゲル(800~1000塩基配列決定が可能)を用いる場合にはDNA断片は600~800塩基長の差を持って調製すればよい。

【0020】

【発明の効果】従来、長いDNAの塩基配列決定では、ショットガン法等によるため、平均すると同じ配列を4~10回繰り返し読み取ることを行っていた。又、クローニング、大腸菌の培養といったやっかいなプロセスを用いるために自動化に不向きであった。一方、制限酵素を用いて短小断片を作り個々の断片の配列を決定してつなげて行く方法もあるが、制限酵素切断で得られる断片サイズは不揃いで一度に解析できないサイズの物も多い。更に断片同士をつなげてゆく手間がかかる難点がある。

【0021】これに対して本発明によれば、ほぼ一定の長さのDNA断片を含む断片群から単一の長さのDNA断片のコピー数を増幅して、長さがほぼ一定の割合で変化する整列したDNA断片群を得ることができる。これらは片側の末端は同じ部位で始まり、反対側の終端側末端位置が一定長さ毎に変化するものであり、一番長いDNA鎖から終端側を順次シーケンシングする。そして、より短いDNA断片の終端近傍の配列と重複するまで配列を読み取ることにより、読み取り配列情報を乗り継ぎ、全配列を効率良く決定できる。

【0022】各DNA断片は長さ毎に整理してあるので、読み取りが重複する部分の配列は50塩基長以下でよく、全体の10~20%程度である。DNA2本鎖の両鎖を読んだとして総重複度は高々2.5であり、従来の1/4~1/2である。一方、この方法ではクローニングを用いる従来法に良く見られる小さなDNA断片が脱落して、各断片が繋がらず、全体配列が決定できないという難点はない。更にクローニングプロセスがないため、自動化が容易になる利点がある。

【図面の簡単な説明】

【図1】長いDNA配列決定法の概念の一例を示す図。

【図2】本発明における酵素を用いる例の概念図。

【図3】本発明に用いるプライマーとDNAフラグメントを導入したオリゴマーの関係を示す図。

【図4】長さのよく似たDNA断片群から一定の長さのDNAフラグメントを得る方法の概念図。

【図5】本発明における物理的切断法を用いる例の概念図。

【図6】本発明における超音波切断法を用いる例の概念図。

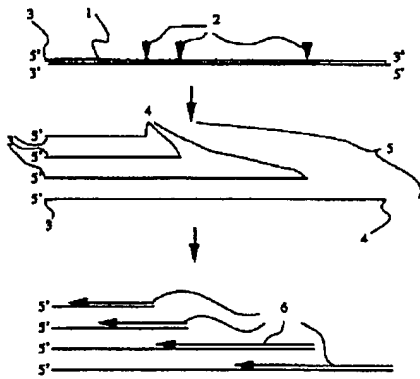
【符号の説明】

1…試料DNA、2…切断箇所、3…一方のDNA端、

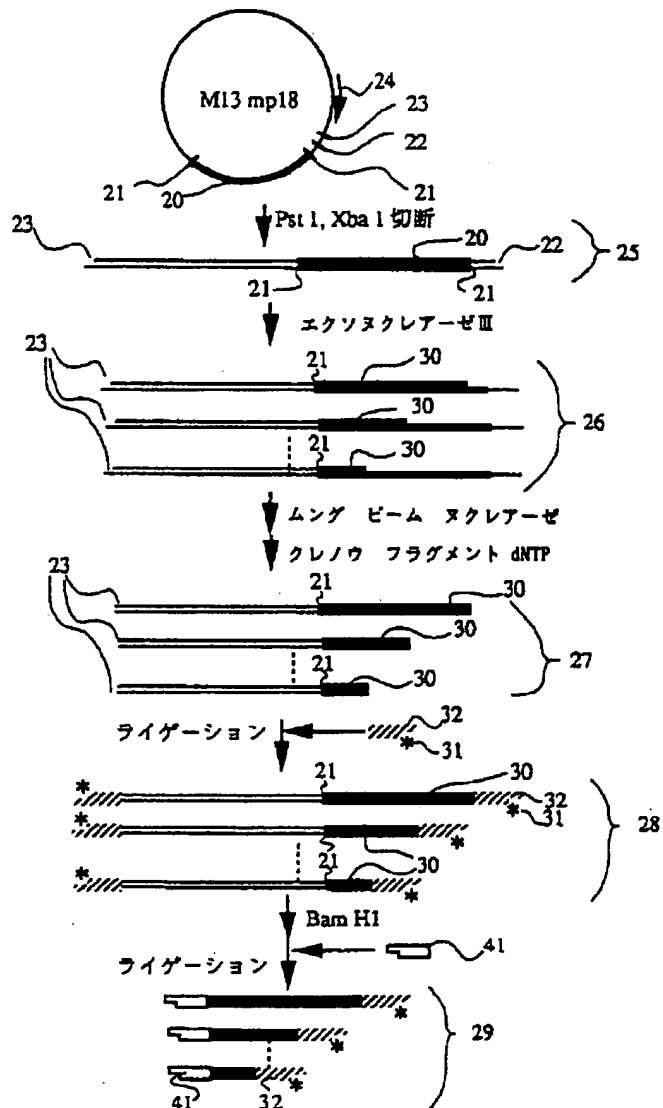
4…他方のDNA端、5…切断されたDNA群、6…配列決定部位、20…試料DNA、21…Bam HIサイト、22…Xba I サイト、23…Pst I サイト、24…プライマニーリング群、25…長いDNA断片、26…Exonuclease III分解を受けたDNAフラグメント、27…末端が平滑化したDNAフラグメント群、28…両端に既知オリゴマーを導入したDNAフラグメント群、29…両端にことなる既知配列オリゴマーを導入したDNAフラグメント群、30…2本鎖部分、31…蛍光体、32…既知配列オリゴマー、41…他の既知配列オリゴマー、51…Bam HIサイト側のオリゴマーに結合するプライマー、52…オリゴマー32側に結合するプライマー、61…共通配列部分、62…共通配列に続く2塩基*

*部分、71…PCR前のDNAフラグメント群の電気泳動パターン、72…PCR後のDNAフラグメントパターン、100…デリションで生じた種々の長さのDNAフラグメント群、101…DNAフラグメント群の変性、再アニールで生じた非相補的部分、102…S1スクレアーゼで分解して生じたギャップ部分、103…ギャップ部分の相補鎖伸長部分、104…長さの揃った2本鎖、110…ライゲーションでDNAに導入したオリゴマー、111…蛍光体、112…ビオチン、120…超音波切断部位、121…他のオリゴマー、130…磁気ビーズ、131…ストレプトアビジン、135…分離されたよく似た長さのDNAフラグメント

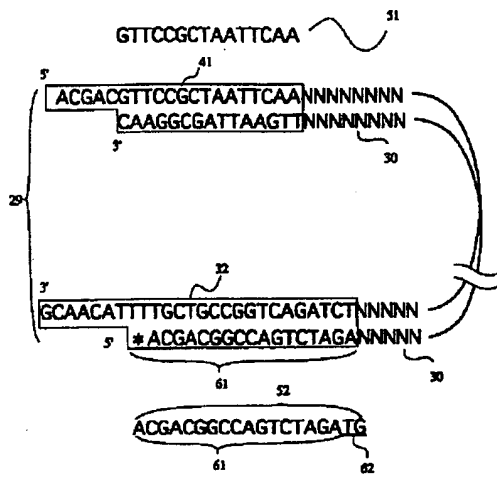
【図1】



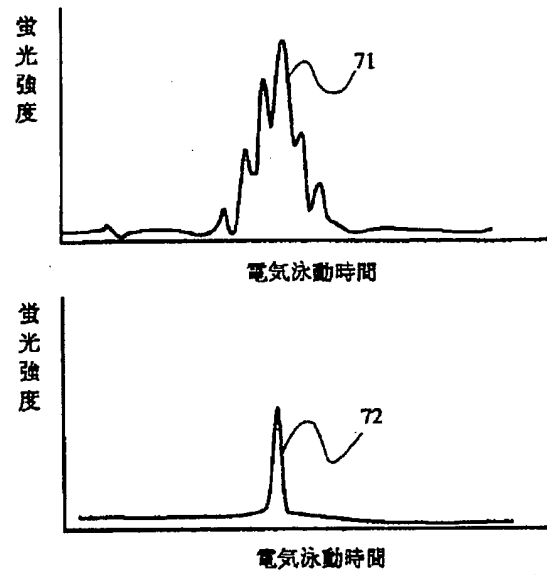
【図2】



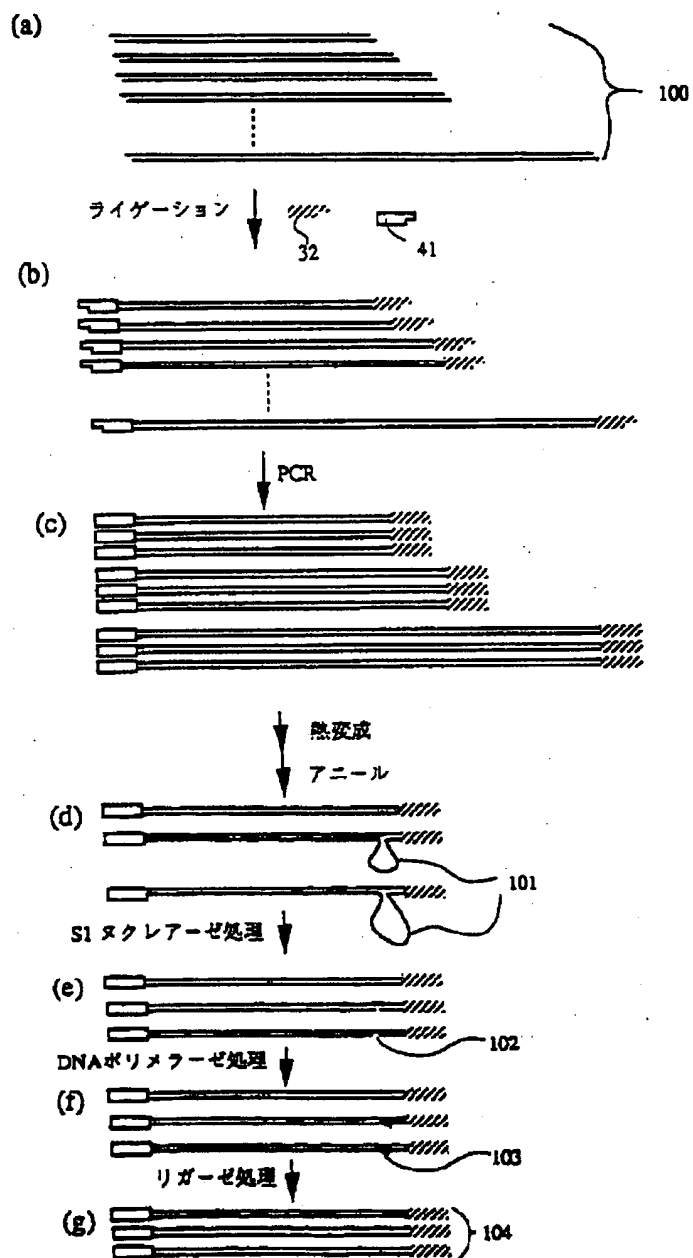
【図3】



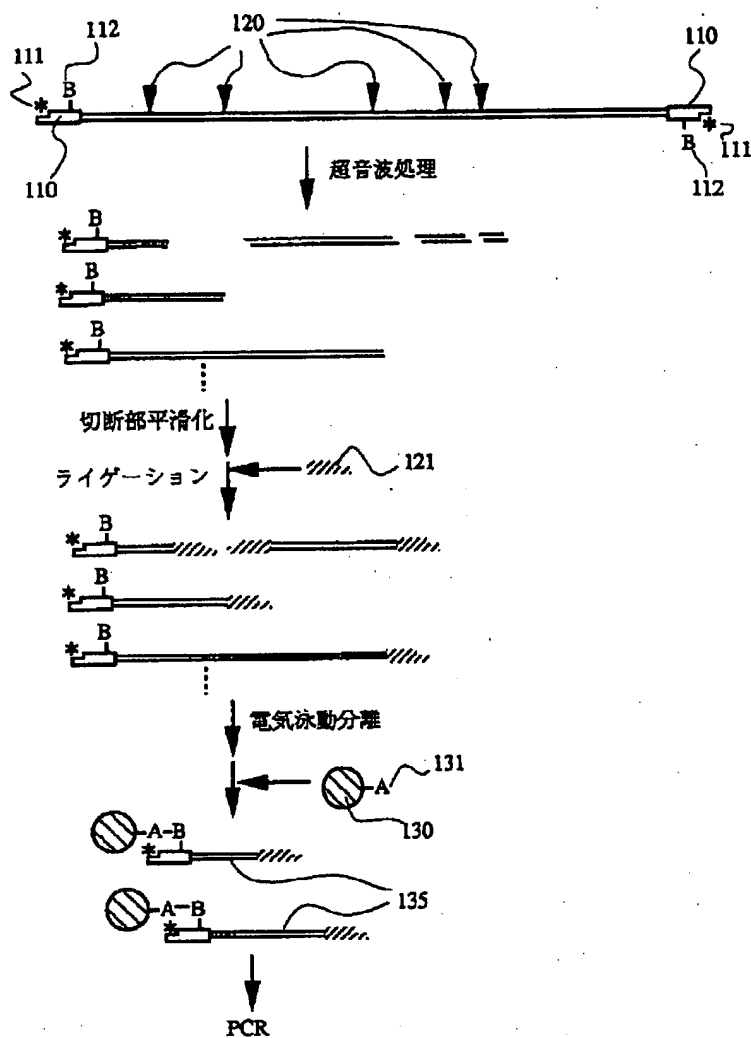
【図4】



【図5】



【図6】



【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第1部門第1区分
 【発行日】平成13年4月3日(2001.4.3)

【公開番号】特開平8-173164
 【公開日】平成8年7月9日(1996.7.9)
 【年通号数】公開特許公報8-1732
 【出願番号】特願平6-320288
 【国際特許分類第7版】

C12N 15/09 ZNA
 G01N 33/566

【F I】

C12N 15/00 ZNA A
 G01N 33/566

【手続補正書】

【提出日】平成12年7月10日(2000.7.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】二本鎖DNAから複数種のDNA断片を生成するプロセスと、
 既知配列を持つオリゴマーを前記DNA断片の末端に結合するプロセスと、
 前記オリゴマーに相補的な配列を含むその3'末端に1塩基～4塩基からなる選別配列を持つプライマーを用いて、PCRにより特定のDNA断片の増幅を行なうプロセスとを有することを特徴とするDNA調製方法。

【請求項2】請求項1に記載のDNA調製方法において、制限酵素により前記二本鎖DNAを切断して前記DNA断片を生成することを特徴とするDNA調製方法。

【請求項3】請求項1に記載のDNA調製方法において、酵素により前記二本鎖DNAを末端消化して前記DNA断片を生成することを特徴とするDNA調製方法。

【請求項4】請求項1に記載のDNA調製方法において、前記DNA断片を生成するプロセスが、一本鎖のループを含む二本鎖DNA断片の前記一本鎖のループの部分にS1ヌクレアーゼにより消化した後に、DNAポリメラーゼ及びリガーゼを用いて前記二本鎖DNA断片を修復するプロセスを含むことを特徴とするDNA調製方法。

【請求項5】請求項1に記載のDNA調製方法において、レーザー又は超音波を用いて前記二本鎖DNAを物理的に切断して前記DNA断片を生成することを特徴とするDNA調製方法。

【請求項6】二本鎖DNAから複数種のDNA断片を

生成するプロセスと、

第一の既知配列を持つ第一のオリゴマーを前記DNA断片の一端に、第二の既知配列を持つ第二のオリゴマーを前記DNA断片の他端に、それぞれ結合するプロセスと、

前記第一のオリゴマーに相補的な配列を含む第一のプライマーと、前記第二のオリゴマーに相補的な配列を含むその5'末端及び3'末端にそれぞれ蛍光標識及び1塩基～4塩基からなる選別配列を持つ第二のプライマーとを用いて、PCRにより特定のDNA断片の増幅を行なうプロセスとを有することを特徴とするDNA調製方法。

【請求項7】二本鎖DNAから複数種のDNA断片を生成するプロセスと、
 既知配列を持つオリゴマーを前記DNA断片の末端に結合するプロセスと、

前記オリゴマーに相補的な配列を含むその3'末端に1塩基～4塩基からなる選別配列を持つプライマーを用いて、PCRにより特定のDNA断片の増幅を行なうプロセスと、

ゲル電気泳動により前記特定のDNA断片を分離して、分取するプロセスとを有することを特徴とするDNA調製方法。

【請求項8】複数種の二本鎖DNA断片の末端に既知配列を持つオリゴマーを結合するプロセスと、

3'末端に1塩基～4塩基からなる選別配列を持ち前記オリゴマーに相補的な配列を含むプライマーを用いて相補鎖合成を行ない特定のDNA断片の増幅を行なうプロセスとを有することを特徴とするDNA調製方法。

【請求項9】二本鎖DNAの両末端に標識されたオリゴマーを結合する第一のプロセスと、

前記第一のプロセスで得た二本鎖DNAを断片化する第二のプロセスと、

前記第二のプロセスで得た二本鎖DNA断片の末端を平

滑化した後にオリゴマーを結合する第三のプロセスと、前記第三のプロセスで得た二本鎖DNA断片をゲル電気泳動によりサイズ分画する第四のプロセスと、前記第四のプロセスでサイズ分画された二本鎖DNA断片をPCR増幅する第五のプロセスとを有することを特徴とするDNA調製方法。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正内容】

【0012】上記制限酵素としては、Sau3A, TaqI, Pst I, MaeI, HindIII, EcoRI 等が用いられる。エクソヌクレアーゼ、SIヌクレアーゼ、リガーゼはいずれも市販の製品が用いられる。次いで末端が特定のDNA配列を持

つ未知のDNA断片を、上記既知配列のオリゴマーに対し相補的なオリゴヌクレオチド配列を含みかつその3'末端に1～4塩基からなる選別配列を持つプライマーを用いてDNA相補鎖合成反応を繰り返し用いて増幅し、DNA断片のコピー数を増やす。ここで、選別配列の塩基数が例えば1塩基の場合は4種類、2塩基の場合は16種類、3塩基の場合は64種類のDNA断片を選択増幅することができる。これにより末端が特定の配列のDNAを精製し、調製することができる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図5

【補正方法】変更

【補正内容】

【図5】DNA断片群の精製の概念を示す図。